

- Computer Translation by JPO -

## PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 2000-072686

(43)Date of publication of application : 07.03.2000

(51)Int.Cl.

A61K 35/78  
A23K 1/16  
A23K 1/18  
A23L 1/30  
A23L 2/52  
A23L 2/38  
A61K 7/00  
A61K 7/48  
A61K 7/50  
A61K 9/06  
A61K 9/08  
A61K 9/20  
A61K 9/48  
// A23G 3/00  
A23G 3/30  
A23L 1/24

(21)Application number : 10-261021

(71)Applicant : TAKASAGO INTERNATL CORP

(22)Date of filing : 01.09.1998

(72)Inventor : KAWADA IZUMI

### (54) ACTIVE-OXYGEN SCAVENGER AND COMPOSITION INCLUDING THE SAME

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To prepare an active-oxygen scavenger having high active-oxygen- scavenging potency and high antioxidative potency, and sparingly having a side-effect on the human body and having safety for the human body by including an extract of seeds (or their husks) of a plant belonging to the geneses Pecan in family Juglandaceae.

SOLUTION: This active-oxygen scavenger includes an extract of seeds (or their husks) of a plant belonging to the genus Pecan in family Juglandaceae. The extract is pref. prepared by extraction with a solvent or a mixed solvent selected from the group consisting of water, methanol, ethanol, n-propanol, iso-propanol and acetone. It is pref. that the quantity of the extract added to food is 0.03-2 wt.% based on the total weight when the food is a seasoning such as fermented soybean paste, soy sauce, mayonnaise, or the like and cooking oil such as salad oil, and is 0.02-2 wt.% based on the total weight when the food is other than those above mentioned. The quantity of the extract added to feed is pref. 0.02-2 wt.% based on the total weight.

---

**LEGAL STATUS**

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

\* NOTICES \*

JPO and NCIPi are not responsible for any damages caused by the use of this translation.

1. This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
2. \*\*\*\* shows the word which can not be translated.
3. In the drawings, any words are not translated.

---

CLAIMS

---

[Claim(s)]

[Claim 1] The active oxygen elimination agent containing the vegetable seed or vegetable seed husks extract belonging to the Juglandaceae pecan group.

[Claim 2] The active oxygen elimination agent according to claim 1 extracted with one sort or two sorts or more of mixed solvents with which an extract according to claim 1 is chosen from water, a methanol, ethanol, n-propanol, iso-propanol, and an acetone.

[Claim 3] The food, feed, or cosmetics containing an active oxygen elimination agent according to claim 1.

---

[Translation done.]

\* NOTICES \*

JPO and NCIPi are not responsible for any damages caused by the use of this translation.

1. This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
2. \*\*\*\* shows the word which can not be translated.
3. In the drawings, any words are not translated.

---

DETAILED DESCRIPTION

---

[Detailed Description of the Invention]

[0001]

[Field of the Invention] This invention relates to the constituent which contains this active oxygen elimination agent in the active oxygen elimination agent list containing the seed of the vegetation which belongs to the Juglandaceae pecan group in detail, or the extract of seed husks about the constituent containing an active oxygen elimination agent and this.

[0002]

[Description of the Prior Art] Oxygen produces the reactive oxygen species (superoxide anion:  $O_2^-$ , hydrogen-peroxide:  $H_2O_2$ , hydroxyl radical:  $OH^\cdot$ , singlet oxygen:  $^1O_2$ , etc.) which were rich in reactivity with many systems of reaction in living body inside and outside, i.e., a part of immunoreactions, ultraviolet rays, radiation irradiation, etc., although production of the energy by the metabolic turnover etc. is the matter indispensable to maintenance of a life for a living body. these reactive oxygen species - for example, while it is helpful for inactivating foreign matters, such as bacteria which invaded in a certain immunoreaction, it reacts with a biogenic substance, peroxidation of a lipid and the denaturation of protein or a nucleic acid are caused, and becoming various diseases and the cause of acceleration of aging is known. Since especially the skin is in the outermost layer of drum of the body, if it is easy to be influenced of the reactive oxygen species generated by extrinsic factors, such as ultraviolet rays and a radiation, and these produce superfluously on the skin, it is known that production of coloring matter with the unusual skins, such as generation of the peroxy lipid by radical reaction, and silverfish, buckwheat dregs, will be reinforced.

[0003]  $O_2$  produced according to the causes of in the living body and various - It is changed into  $H_2O_2$  by super-oxide dismutase (it outlines Following SOD), and  $H_2O_2$  are further decomposed into water and oxygen by operation of a catalase and glutathione peroxidase. In addition to these enzymes, the antioxidant of the food origins, such as vitamin C and vitamin E, exists in the living body, the network where these control radical reaction and oxidation reaction in the living body is formed, and it is thought that it is in charge of defense of many failures by active oxygen. However, the infection by change of a perimeter and an environment in the living body, for example, bacteria, a virus, etc., If the balance of the above-mentioned network collapses by various stress, aging, aging, etc. which are received from change of the intake condition of food, or the nutriture, the superfluous exposure of ultraviolet rays, and a perimeter The metabolic turnover balance of the active oxygen produced in the living body collapses. As a result The increment in the amount of peroxy lipid, Many symptoms acting as the failure on cosmetics, such as dermatitis, silverfish, Siwa, eczema, and buckwheat dregs, appear, and it is known that diseases, such as articular rheumatism, arteriosclerosis, diabetes mellitus, hepatitis, a nephritis, and cancer, will be caused further.

[0004] Moreover, the peroxidation and denaturation of the component of a lipid and others which are included in them take place also about the food and the food additive which we take in by the oxidation and the usual oxidation by the active oxygen generated according to an operation of ultraviolet rays and a radiation, and it is well-known that intake of these oxidation and a denaturation object is not desirable

on healthy. Furthermore, into the natural oil fat containing the partial saturation lipid which may be blended with cosmetics and skin external preparations, or a surfactant, it is known according to an operation of ultraviolet rays etc. that there are some which are easy to receive oxidation, and the phenomenon which neither discoloration nor generating of a nasty smell has as a result happens in many cases. Many symptoms acting as [ with the activity of the cosmetics basis which is easy to receive such oxidation / the amount of the peroxy lipid produced on the skin according to many above-mentioned causes increases, and ] the failure on the above-mentioned cosmetics being amplified is guessed easily.

[0005] As natural oil fat which is easy to receive these oxidization, the surface active agent of partial saturation systems, such as a mono-oleic acid glycerol and triolein acid polyoxyethylene sorbitan, is mentioned as the fats and oils of partial saturation systems, such as an almond oil, olive oil, jojoba oil, and squalene, and a surface active agent which is easy to receive oxidization. Conventionally, as an anti-oxidant added by cosmetics, food, a food additive, and feed, there are natural anti-oxidants, such as an ascorbic acid besides synthetic anti-oxidants, such as dibutylhydroxytoluene (BHT), butylhydroxyanisole (BHA), and ethoxyquin, and vitamin E. Although the antioxidation effectiveness is excellent, the above-mentioned synthetic anti-oxidant has some which have a problem in safeties, such as carcinogenic, and has some which are restricted about the activity. On the other hand, although the anti-oxidant of the above-mentioned natural origin is evaluated about safety, the fault of being considerably inferior to a synthetic anti-oxidant has the antioxidation effectiveness.

[0006] the perfumery and cosmetics of the matter which has the active oxygen elimination effectiveness and the antioxidation effectiveness in recent years for an improvement and prevention of the above-mentioned everything elephant, or a constituent -- scientific and food science ---like -- retrieval from a pharmacological standpoint is performed actively again, consequently most number of active oxygen elimination agents and anti-oxidants came to be known. For example, in JP,4-34969,B, the active oxygen elimination agent to which active oxygen elimination and the remover to which the active oxygen elimination agent which consists of DEHAIDOROJIOIGE Norian whose active oxygen elimination agent containing the BAIKA lane which is the flavonoid component contained in a Scutellaria root is a clove oil or its component in JP,3-227938,A makes the Aspara Sas RINEARISU extract an active principle in JP,5-271063,A make a walnut husks extract an active principle by JP,7-69912,A again is proposed.

[0007] The charge of makeup and food which blended the component which has the active oxygen elimination effectiveness are also proposed. Furthermore, in JP,5-32556,A The skin external preparations which added SOD further to the ginkgo tree extract which has an active oxygen clearance operation in JP,5-316963,A The charge of makeup and food which make the extract component of URAJIROGASHI and/or SHIRAKASHI an active principle in JP,6-65043,A The skin external preparations characterized by containing one sort or two sorts or more, and SOD of the extract of the vegetation chosen from the mica cuttlefish, the Chinese quince, and Prunus japonica Thunb. which have an active oxygen clearance operation the constituent (cosmetics --) which makes an active principle the peroxy lipid generation inhibitor and this which make an active principle the Pelargonium domesticum group plant extract which has a high active oxygen clearance operation and peroxy lipid generation depressor effect in JP,6-183987,A food and drugs -- moreover, in JP,7-213251,A, the healthy eating-and-drinking article which added the antioxidant extracted from the cacao bean is proposed.

[0008]

[Problem(s) to be Solved by the Invention] The object of this invention has active oxygen elimination ability and dramatically high antioxidation ability, and there are few side effects over the body, and they are offering an active oxygen elimination agent with high safety, and offering the constituent (food, feed, or cosmetics) containing this. In order that this invention persons may solve the above-mentioned technical problem, as a result of inquiring wholeheartedly, there being active oxygen elimination ability very strong against the extract which extracts the vegetable seed or vegetable seed husks of the Juglandaceae pecan group used as edible with organic solvents and these mixed solvents, such as water, hot water, a methanol, ethanol, propanol, and an acetone, and is obtained, and antioxidation ability, and this extract found out that safety was high, and completed this invention.

[0009]

[Means for Solving the Problem] That is, this invention according to claim 1 is Juglandaceae (Juglandaceae). It is an active oxygen elimination agent containing the vegetable seed or vegetable seed husks extract belonging to a pecan group (Carya). This invention according to claim 2 is an active oxygen elimination agent according to claim 1 extracted with one sort or two sorts or more of mixed solvents with which an extract according to claim 1 is chosen from water, a methanol, ethanol, n-propanol, iso-propanol, and an acetone. This invention according to claim 3 is the food, feed, or cosmetics containing an active oxygen elimination agent according to claim 1.

[0010]

[Embodiment of the Invention] This invention is explained below at a detail. The vegetation of the Juglandaceae pecan group used by this invention is distributed over Central America mainly from North America, the embryonic area of the seed is made edible from ancient times, and the seed itself is called pecan nuts or PIKAN nuts. The active oxygen elimination agent of this invention makes an active principle the extract which extracts preferably the seed or seed husks of the Juglandaceae pecan group vegetation concerned with the hydrated compound of the above-mentioned organic solvent in the independence of organic solvents, such as water, hot water, a methanol, ethanol, n-propanol, iso-propanol, and an acetone, or the mixed solvent of these water and organic solvents, and a mixed solvent, and is obtained.

[0011] What is necessary is not to limit especially the extract approach and just to perform it according to a conventional method. Below, the desirable extract approach is explained. What is necessary is not to limit especially the amount of the extracting solvent used, and just to let it be the amount of five to 100 times of the weight of the usually used pecan nuts or its husks. What is necessary is just to carry out at about 20 degrees C - 120 degrees C about extract temperature, in using water or hot water as an extracting solvent. Although it is not limited especially when using an organic solvent or a water organic solvent as an extracting solvent, it extracts under the temperature of 20 degrees C - 30 degrees C preferably especially under a room temperature. Moreover, in water or a hot water extract, about extract time amount, it is good at about 5 - 60 minutes, but in the extract by the organic solvent or the water organic solvent, 24 - 96 hours is suitable. After extracting, each extracting solvent fusible part is obtained with means using a filter paper, absorbent cotton, etc., such as natural filtration and filtration under reduced pressure, subsequently a solvent is distilled off with means, such as vacuum concentration, and the active principle of this invention is obtained by performing freeze drying and spray drying if needed further.

[0012] In this way, since the effectiveness is stable, without being lost even if the active principle of this invention obtained has the very high active oxygen elimination effectiveness and the antioxidation effectiveness, and its safety is high and it adds processing means, such as heating, stability and a useful active oxygen elimination agent, or an anti-oxidant can be obtained by making the active principle of this invention contain. Moreover, what blended said active principle itself with constituents, such as food and cosmetics, or pharmaceutical-preparation-ized this active principle beforehand is blended with said constituent, the active oxygen elimination effectiveness and the antioxidation effectiveness are granted, and the active oxygen elimination agent or anti-oxidant of this invention can raise the commodity value of said constituent.

[0013] In the case of a tablet, a capsule, powder, or a granule, as an example of pharmaceutical-preparation-izing, it can pharmaceutical-preparation-ize by prescribing the above-mentioned active principle abundant agents, such as disintegrator, such as binders, such as allocated type agents, such as starch, a lactose, and mannitol, a carboxymethyl cellulose, and hydroxypropylcellulose, crystalline cellulose, and carboxymethyl-cellulose calcium, talc, and magnesium stearate, and if needed [ other ], combining a wetting agent, a coloring agent, perfume, etc. suitably. Moreover, that what is necessary is just to make it water or oily an opacifier and syrups as liquids and solutions, antiseptics, a preservative, a stabilizing agent, etc. can be blended suitably and can be pharmaceutical-preparation-ized emulsifiers, such as suspending agents, such as simple syrup, a sorbitol, methyl cellulose, and carboxymethylcellulose sodium, yolk lecithin, sorbitan mono-fatty acid ester, lauromacrogol, and castor

oil, and if needed [ other ]. In the case of ointment, emulsifiers, such as hydrophilic radical agents, such as hydrophobic radical agents, such as vaseline, paraffin, silicon, Plastibase, vegetable oil, and lows, purified lanolin, a carboxyvinyl polymer, propylene glycol, and 1,3-butanediol, and the poly ethanolamine, etc. can be blended suitably, and it can pharmaceutical-preparation-ize them.

[0014] As a gestalt of food, various things can be mentioned among the constituents of this invention, for example, it adds and mixes and also confectionery, drinks, etc., such as various cooking food; desserts, ice cream, a candy, chewing gum, and fruit juice, can be mentioned to edible oil, such as seasonings, such as bean paste, soy sauce, and mayonnaise, and salad oil. The component of the arbitration which responded in activity eye can be used for such food. For example, in the case of ice cream or a drink, fruit juice, sweeteners, an acidulant, a coloring agent, perfume, etc. can be blended suitably. Although what is necessary is just to change suitably the addition to the food of the active principle of this invention according to the gestalt, it is desirable to consider as 0.02 - 2 % of the weight at edible oil, such as seasonings, such as bean paste, soy sauce, and mayonnaise, and salad oil, in the case of the food of 0.03 - 2% of the weight of the whole and others, for example.

[0015] As a gestalt of feed, various things can be mentioned among the constituents of this invention, for example, the mixed feed of the powder livestock, domestic fowls, and for fishes, the shape of boiled fish paste, and a pellet type can be mentioned. The component of the arbitration which responded in activity eye can be used, for example, when it is boiled-fish-paste-like feed, a coloring agent, perfume, etc. can be suitably blended with these feed. Although what is necessary is just to change suitably the addition to the feed of the active principle of this invention according to the gestalt, it is desirable to carry out to 0.02 - 2% of the weight of the whole generally.

[0016] As a gestalt of cosmetics, various things can be mentioned among the constituents of this invention, for example, the charge of washing their face, the charge of a pack, the charge of makeup, a charge of hair makeup, a charge of lips makeup, a charge for pawls of makeup, bath liquids, antiperspirants, etc. including a lotion, a milky lotion, and a cream are mentioned. The component of the arbitration which responded in activity eye can be used, for example, when it is a cream, a nutrient, a moisturizer, a whitening agent, an ultraviolet ray absorbent, etc. can be suitably blended with these cosmetics according to a conventional method emulsifiers, such as hydrophilic radical agents, such as hydrophobic radical agents, such as vaseline, paraffin, and squalane, lanolin, propylene glycol, and 1,3-butanediol, fatty acid monoglyceride, and sorbitan fatty acid esters, antiseptics, a pigment, perfume, and if needed [ other ]. Similarly, the need component according to the class can be suitably blended also about other products. Although what is necessary is just to change suitably the addition to the cosmetics of the active principle of this invention according to the gestalt, it is desirable to carry out to about 0.02 - 2% of the weight of the whole cosmetics.

[0017] As mentioned above, the active oxygen elimination agent of this invention can be added and used for constituents, such as food, feed, and cosmetics, while endowing the active oxygen elimination effectiveness and the antioxidation effectiveness with these constituents and planning stability of these constituents, it can be protected from many failures by active oxygen or peroxy lipid also to the intake person or user of these constituents, and it is very useful.

[0018]

[Example] Next, this invention is not restricted by these although an example etc. explains this invention in detail.

The seed husks which removed and obtained the edible section of example of manufacture 1 pecan nuts were pulverized, and water ethanol 500ml (it is the same a milliliter and the following) was added to 100g of the grinding object 50%, and under the room temperature, it put for 48 hours and extracted. Vacuum concentration of the obtained water ethanol fusible part was carried out under 40 degrees C after filter paper filtration, ethanol and water were distilled off, it freeze-dried further and the target active principle (7.2g of brown fine particles, 7.2% of yield) was obtained.

[0019] Example of manufacture 2 pecan nuts were ground as it was, and 50 capacity % water ethanol 500ml was added to 100g of the grinding object, and under the room temperature, it put for 48 hours and extracted. Vacuum concentration of the obtained water ethanol fusible part was carried out under 40

degrees C after filter paper filtration, ethanol and water were distilled off, it freeze-dried further and the target active principle (7.4g of brown fine particles, 7.4% of yield) was obtained.

[0020] 500ml of distilled water was added to 100g of seed husks grinding objects obtained like the example 1 of example of manufacture 3 manufacture, and the heating extract was performed for 10 minutes under 110 degrees C. Vacuum concentration after cooling and of the water fusible part was carried out under 50 degrees C after filter paper filtration to the room temperature, water was distilled off, it freeze-dried further and the target active principle (6.5g of fine particles of light brown, 6.5% of yield) was obtained.

[0021] The infrared absorption spectrum of the active principle obtained by each above-mentioned example of manufacture was as follows. in addition, this spectrum measuring device -- IR[ by Jasco Corp. ]-810 mold, and a sample preparation method -- KBr -- it carried out by law.

absorption peak 3400- of the active principle obtained by the example 1 of manufacture -- the absorption peaks 3400-3300 (broad) of the active principle obtained by the absorption peaks 3400-3300 (broad) of the active principle obtained by 3300 (broad), 2925, 1615, 1450, and the example 2 of 1040 or 830cm-1 manufacture, 1615, 1550, 1450 and 1350, and the example 3 of 1200 or 840cm-1 manufacture, 1615, 1450, 1350, 1200 and 1040, and 830cm-1[0022 -- ] Example 1 of a trial Super oxide (O2-) O2 of the active principle of elimination trial this invention - The elimination effectiveness It investigated by the nitroblue tetrazolium (NBT) reduction which changed the 1 section (Analytical Biochemistry, vol.44, pp.276-287 (1971)) of C.Beauchamp's and others approaches. This method is O2 produced when xanthine oxidase (XOD) is made to act on hypoxanthine (HPX). - It is an approach using returning NBT and generating the formazan of dark blue. It is O2 to this system. - If the matter (specimen = active principle of this invention) which has the elimination effectiveness exists, since the amount of the formazan to generate will decrease, the rate of formazan generation inhibition is calculated from the amount of formazan generation at the time of the active principle addition to the amount of formazan generation at the time of active principle additive-free, and it is O2 of the active principle of this invention. - It considered as the rate of elimination. Moreover, it is O2 when it has the effectiveness that a specimen checks an enzyme operation of XOD, in this method. - It is O2 even when it does not have the elimination effectiveness. - Since the rate of elimination becomes high seemingly, the active principle of this invention is not the inhibition effectiveness of XOD but O2. - In order to check having the elimination effectiveness, the rate of XOD inhibition of this active principle was also examined.

[0023] <O2 - To 2.4ml (pH10.2) of measuring method >50mM (it is the same millimol concentration and the following) sodium-carbonate buffer solutions of the rate of elimination 3mM(s) 0.1ml of HPX water solutions, 0.75mM 0.1ml of NBT water solutions, 3mM(s) In the solution which consists of 0.1ml of EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid) water solutions, and 0.1ml of 0.15% bovine-serum-albumin water solutions, a specimen solution (50% water ethanol solution containing 0.3 % of the weight of active principles of this invention obtained in each example of manufacture) The mixed liquor added so that the last concentration of the active principle in reaction mixture might turn into concentration shown in the 1st table of a postscript is taken to a cuvette (absorption wavelength measurement cel). 0.1ml of XOD solutions diluted with purified water to 0.05U (enzyme unit) was added, the reaction was started, the absorbance (A) in 560nm 3 minutes after initiation was measured with the spectrophotometer (the Jasco Corp. make, UVDEC430B), and the amount of formazan generation was calculated. As contrast, the absorbance (B) was similarly measured using the mixed liquor which added 50% water ethanol of tales doses instead of the specimen solution. Furthermore, an absorbance (C) is similarly measured about the reaction mixture which added the XOD solution which carried out heating deactivation to specimen mixed liquor as a blank of specimen mixed liquor, and it is O2 of the active principle of this invention from the degree type 1. - The rate of elimination was calculated.

[0024]

[Equation 1]

$$O_2^- \text{ 消去率(\%)} = \frac{B - (A - C)}{B} \times 100 \quad (1)$$



[0025] <Measuring method of rate of XOD inhibition> above O<sub>2</sub> - 0.75mM(s) in the rate measuring method of elimination The absorbance (X) in 290nm 3 minutes after adding a XOD solution like the above-mentioned approach was measured using the mixed liquor which added 0.1ml of purified water instead of the NBT water solution, and the amount of generation of the uric acid which HPX oxidizes by XOD and produces was calculated. As contrast, the absorbance (Y) in 290nm was similarly measured using the mixed liquor which added 50% water ethyl alcohol of tales doses instead of the specimen solution. Furthermore, the absorbance (Z) was similarly measured about the reaction mixture which added the XOD solution which carried out heating deactivation to specimen mixed liquor as a blank of specimen mixed liquor, and the rate of inhibition of XOD of the active principle of this invention was calculated from the degree type 2. The above result was shown in the 1st table.

[0026]

[Equation 2]

$$\text{XOD阻害率(\%)} = \frac{Y - (X - Z)}{Y} \times 100 \quad (2)$$

[0027]

[A table 1]

第1表

検体	反応液中の有効成分の濃度 (ppm)	O <sub>2</sub> 消去率 (%)	XOD阻害率 (%)
製造例1で 得た検体	100	99.4	4.1
	50	98.1	0.0
	25	96.9	0.0
製造例2で 得た検体	100	97.4	0.0
	50	95.1	0.0
	25	89.8	0.0
製造例3で 得た検体	100	97.2	0.0
	50	93.5	0.0
	25	86.2	0.0

[0028] It is O<sub>2</sub> [ very high ], without checking most enzyme operations of XOD, even if it is the specimen which obtained the active principle of this invention according to which manufacturing method as shown in the 1st table. - It is clear that the elimination effectiveness is shown.

[0029] example 2 of a trial OH and the elimination effectiveness of the active principle of hydroxyl radical (OH<sup>-</sup>) elimination trial this invention -- B.Halliwell \*\* -- the deoxyribose method (Analytical Biochemistry, vol.165, pp.215-219 (1987)) It investigated by the approach changed the 1 section. By making the malondialdehyde (MDA) produced by the reaction of the OH<sup>-</sup> and deoxyribose which are generated from a Fenton's reagent (oxidization color reagent which mixed the hydrogen peroxide and the iron [II] salt) react with thiobarbituric acid (TBA), this method makes a red reactant generate and is searched for by measuring an absorbance [ in / for this amount of generation / 532nm ] (TBA value). Since the amount of generation of MDA decreased, therefore the TBA value decreased when the matter (specimen = active principle of this invention) which has OH and the elimination effectiveness existed in this system, from the TBA value at the time of the active principle addition of this invention to the TBA value at the time of active principle additive-free [ of this invention ], it asked for the rate of MDA generation inhibition, and considered as OH and the rate of elimination of the active principle of this invention.

[0030] <Measuring method of OH and rate of elimination> 200mM 0.2ml (pH7.4) of potassium-dihydrogenphosphate-potassium-hydroxide buffer solutions, 28mM(s) Deoxyribose water solution 0.2ml, 1mM Ferric-chloride water solution 0.2ml, 1mM Ascorbic-acid water solution 0.2ml, 1.04mM EDTA water solution 0.2ml, Purified water 0.6ml, 10mM The mixed liquor which consists of H<sub>2</sub>

0.2ml and 0.2ml (solution diluted with water so that the last concentration of the mannitol used as the active principle and positive control of this invention obtained in the example 1 of manufacture might be set to 200 ppm) of specimen solutions 2ml of trichloroacetic acid water solutions and 1ml of 0.67%TBA water solutions were added 20%, and it was [ ebullition ] under water bath, and after making it react under 37 degrees C for 1 hour, it heated for 10 minutes. The absorbance [ in / for this solution / 532nm ] (E) was measured with the spectrophotometer (the Jasco Corp. make, UVDEC 430B) after radiationnal cooling to the room temperature, and the TBA value was calculated. As a blank of specimen mixed liquor, it is 10mM. H2 O2 The mixed liquor which added purified water instead is used. Similarly Absorbance (F), Purified water is added instead of a specimen solution as the absorbance (G) at the time of adding purified water instead of a specimen solution as contrast, and a blank of contrast, and they are 10mM(s). H2 O2 The absorbance (H) at the time of adding purified water instead is measured. The active principle of this invention, and OH and the rate of elimination of positive control were calculated by the formula 3. The above result was shown in the 2nd table.

[0031]

[Equation 3]

$$\text{OH} \cdot \text{消去率} (\%) = \frac{(G-H) - (E-F)}{(G-H)} \times 100 \quad (3)$$

[0032]

[A table 2]

第2表

検 体	最終濃度 (p p m)	OH・消去率 (%)
製造例1で得た成分	200	60.2
マニトール	200	38.2

[0033] As shown in the 2nd table, it is clear the active principle's of this invention to have the very high OH and elimination effectiveness.

[0034] example 3 of a trial Peroxidation depressor effect of the lipid of the active principle of peroxidation inhibition test this invention of a lipid A.Jitoe \*\* -- according to the approach (Journal ofAgricultural and Food Chemistry, vol.40, pp.1337-1340 (1992)), it investigated by the thiocyanic acid method, using linolic acid as a lipid. This method is the approach of using that the first iron ion oxidizes to a ferric ion, and using the generated ferric ion as thiocyanogen complex salt, and carrying out colorimetry with the peroxide of linolic acid.

[0035] 4.104ml of 2.53-% of the weight linolic acid solutions which dissolved in ethanol 4ml and 99.5% ethanol <measuring method of rate of lipid-peroxidation control> 99.5%, 50mM(s) To 8ml (pH7.0) of phosphate buffer solutions, and 3.896ml of distilled water After putting in the reaction mixed liquor which added 4mg for the specimen obtained in the examples 1 and 2 of manufacture respectively into the vial of 50ml capacity with a screw cap and giving a screw cap, it was left in the humidistat set to 40 degrees C under dark. In addition, the reaction mixed liquor which added dibutylhydroxytoluene and 4mg of alpha-tocopherol instead of the active principle of this invention, respectively was prepared as positive control. Water ethanol 9.7ml and 0.1ml of 30% ammonium thiocyanate water solutions were added to 0.1ml of each reaction mixture 75% eight days after experiment initiation. 0.02M dissolved in hydrochloric-acid water 3.5% at this 0.1ml of ferrous chloride solutions was added, and the absorbance (I) in 500nm of 3 minutes after was measured to accuracy. Furthermore, the absorbance (J) when not adding the active principle or positive control of this invention was measured as a blank, and the rate of lipid-peroxidation control of each component was calculated from the degree type 4. The above experimental result was shown in the 3rd table.

[0036]

[Equation 4]

$$\text{脂質過酸化抑制率 (\%)} = \frac{J - 1}{J} \times 100 \quad (4)$$

[0037]

[A table 3]

第3表

検体	反応混合液中の添加成分 の最終濃度 (ppm)	脂質過酸化抑制 率 (%)
製造例1で得た成分	200	66.7
製造例2で得た成分	200	74.7
$\alpha$ -トコフェロール	200	49.3
ジブチルヒドロキシルエーテル	200	97.3

[0038] As shown in the 3rd table, it is clear the active principle's of this invention to have very strong lipid-peroxidation depressant action.

[0039] The active principle of example this invention of a comparison is the seed of the vegetation belonging to the Juglandaceae pecan group, or the extract of seed husks. On the other hand, the extract of walnut husks, such as demon GURUMI of Juglandaceae and MANSHUUGURUMI, is clarified by that the active oxygen elimination effectiveness is shown like the above-mentioned (JP, 7-69912, A). Then, it is those yield and O<sub>2</sub> about the extract of a walnut (Walnut; WORU nuts), and the extract of the husks of the pecan nuts of this invention. - The existence of the difference between the rate of elimination and a component was examined.

[0040] (1) The husks which removed and obtained the husks which removed and obtained the edible section of the yield pecan nuts of an extract, and the edible section of a walnut were pulverized independently, and each grinding object was obtained. By dividing into two, it put 100g of grinding objects of the husks of pecan nuts at a time into the Erlenmeyer flask of 1L \*\*, and water ethanol was added to one 50%, and 500ml of distilled water was added to one more, respectively. It was made completely the same also about the grinding object of the husks of a walnut for 2 minutes, and put 100g at a time into the Erlenmeyer flask of 1L \*\*, and water ethanol was added to one 50%, and 500ml of distilled water was added to one more, respectively. About each grinding object which added water ethanol 50%, after leaving it under a room temperature for 48 hours, 1 evening freeze drying of the extract which filtered and was obtained except for residue was carried out after the bottom vacuum concentration of 40 degrees C, and 50% water ethanol extract of the husks of pecan nuts and 50% water ethanol extract of the husks of a walnut were obtained. About each grinding object which added distilled water, after carrying out a heating extract for 30 minutes under 110 degrees C, 1 evening freeze drying of the extract which filtered and was obtained except for residue was carried out after the bottom vacuum concentration of 40 degrees C, and the hot water extract of the husks of pecan nuts and the hot water extract of the husks of a walnut were obtained. The yield to each husks grinding object of each extract is as being shown in the 4th table.

[0041]

[A table 4]

第4表 ベカンナッツおよびクルミの殻のエキスの各溶剤による収率

抽出材料	抽出溶剤	エキスの収率 (%)
ベカンナッツの殻	50%含水エタノール	6.3
クルミの殻	50%含水エタノール	2.1
ベカンナッツの殻	熱水	6.5
クルミの殻	熱水	2.4

[0042] The 4th table shows that the extract of the husks of pecan nuts has yield 2.7 to 3 times higher than the extract of the husks of a walnut in the extract by both solvents.

(2) O<sub>2</sub> of each extract - O<sub>2</sub> of each extract obtained by the elimination activity above (1) - Elimination activity is authorized by the aforementioned nitroblue tetrazolium reduction. The ED<sub>50</sub> value (O<sub>2</sub> calculated from the absorbance when not adding a specimen - O<sub>2</sub> when making a production rate into 100% - concentration of a specimen required to make elimination activity into 50%) of each extract was calculated, and the strength of this activity of each extract was compared. The ED<sub>50</sub> value of each extract is as being shown in the 5th table.

[0043]

[A table 5]

第5表 各エキスのO<sub>2</sub>- 消去活性のED<sub>50</sub>値

抽出材料	抽出溶剤	ED <sub>50</sub> 値 (ppm)
ベカンナッツの殻	50%含水エタノール	2.5
クルミの殻	50%含水エタノール	11.0
ベカンナッツの殻	熱水	3.1
クルミの殻	熱水	10.0

[0044] As shown in the 5th table, it is O<sub>2</sub> of a specimen. - Judging from the ED<sub>50</sub> value which shows the strength of elimination activity, an ED<sub>50</sub> value is 3.2 to 4.4 times as low as the extract of the husks of a walnut, and the direction of the extract of the husks of pecan nuts is O<sub>2</sub> [ strong against Haruka ]. - It is clear to have elimination activity.

[0045] (3) About the hot water extract of the husks of the walnut manufactured according to the hot water extract and this example of husks of pecan nuts which were acquired in the example 3 of component manufacture of each extract, it examined whether a difference would be in those components by thin-layer chromatography (the TLC method) and the activated-charcoal-absorption method.

\*\* The Measuring condition of the TLC method TLC is as being shown below.

Thin-layer plate: Silica gel 60 F254 (MERCK shrine make)

expansion solvent: -- 1-butanol: -- acetic-acid: -- water =6:3:1 expansion: -- primary expansion distance:

-- 12cm sample concentration: -- 300 ppm coverage: -- 5microl / spot detection: -- UV (254nm and 302nm) and iodine coloring [0046] The result depended on the TLC method of describing above the hot water extract of pecan nuts husks and walnut husks is as being shown in the 6th table.

[0047]

[A table 6]

第6表

エキス	Rf値
ベカンナッツの殻の熱水エキス	0.014, 0.59
クルミの殻の熱水エキス	0.21, 0.61

[0048] As shown in the table, the hot water extract of pecan nuts husks was divided into three components, and, on the other hand, the hot water extract of walnut husks was divided into two components. From the difference of each Rf value, it is judged that the component of these extracts is a mutually different component.

[0049] \*\* it becomes the same concentration (0.3% [weight/capacity]) about the hot water extract of activated-charcoal-absorption method pecan nuts husks, and the hot water extract of walnut husks -- as -- water -- dissolving -- these solutions -- twice (weight) as many activated carbon (activated carbon (powder)) (unsettled):Nakarai Tesuku make as each extract -- in addition, it stirred under the room temperature for 4 hours. Then, it freeze-dried, after filtering each processing liquid using the filter paper (5C type: Toyo Roshi Kaisha, Ltd. make) and carrying out vacuum concentration of the filtrate. The freeze-drying object of each obtained filtrate is dissolved in water so that it may become 0.3% (weight/capacity), respectively, and it is O2 of each solution. - Elimination activity was measured. In addition, as contrast, the water solution before the aforementioned activated carbon treatment (0.3% [weight/capacity]) was used. O2 of each solution - The measurement result of elimination activity is as being shown in the 7th table.

[0050]

[A table 7]

第7表

検 体	反応液中の成分 の濃度 (ppm)	O <sub>2</sub> 消去率 (%)
ペカンナッツの殻の熱水エキス (活性炭処理後のろ液の凍結乾燥物)	100	97.4
ペカンナッツの殻の熱水エキス (対照)	100	99.3
クルミの殻の熱水エキス (活性炭処理後のろ液の凍結乾燥物)	100	1.3
クルミの殻の熱水エキス (対照)	100	93.4

[0051] It is [ \*\*\*\*\* from a table ] O2 of the freeze-drying object of the filtrate after the activated carbon treatment of the hot water extract of pecan nuts husks like. - The rate of elimination is O2 of the freeze-drying object of the filtrate after the activated carbon treatment of the hot water extract of walnut husks, although most change is not seen as compared with contrast. - The rate of elimination is decreasing compared with contrast. Therefore, O2 of the hot water extract of pecan nuts husks - An elimination active ingredient is O2 of the hot water extract of walnut husks to not being the component which loses this activity by activated carbon treatment. - An elimination active ingredient is O2 of these extracts since this activity is lost by activated carbon treatment. - It is judged that an elimination active ingredient is a different component.

[0052] As a safety test of the active principle of example of trial 4 this invention, the acute toxicity test (rat) by single time internal use, the mutagenicity test (1535 100 98 Salmonella typhimurium (Salmonella typhimurium) TA TA TA TA Ames test using 1537 and Escherichia coli (Escherichia coli) WP2uvra), the skin sensitization test (a guinea pig and Homo sapiens patch test), the primary skin irritation test (guinea pig), and the phototoxicity trial (guinea pig) were carried out.

[0053] (1) The death rate was 0% when the active principle of this invention obtained in the example 2 of manufacture was administered orally so that it might become in kg and 2g (weight) /, and it was usually succeedingly bred for two weeks to five Wister system male rats of 180g of acute toxicity specimen piles by single time internal use. Therefore, the 50% lethal dose (fifty percent lethal dose) of the active principle of this invention is 2g/kg or more, and it judged that it is [ toxicity ] very low.

[0054] (2) The Ames test was performed using mutagenicity test above-mentioned each bacillus. Since the colony count grown irrespective of the existence of a metabolic activation system did not exceed the twice of the reverse mutation colony count of a negative control (active principle additive-free of this invention) in which sample offering bacillus as a result of examining by adding the active principle of

this invention obtained in the example 2 of manufacture so that it may become each petri dish with 200microg to 5000microg, it was judged with the mutation of the active principle of this invention being negative.

[0055] (3) Sensitization sex test (patch test to a guinea pig)

When the regions of back of ten female guinea pigs of a with a weights [ 330-400g ] Hartley system were shaved, 20micro of acetone solutions 1 which contain the active principle of this invention obtained in the example 2 of manufacture 5% of the weight was applied and the adjuvant patch test was performed, the rate of a positivity is 0% and was judged that the sensitization nature of the active principle of this invention is very low.

[0056] (4) Sensitization sex test (patch test to Homo sapiens)

When the patch test was given to 30 20-55-year-old healthy man and woman according to the conventional method using the lanolin solution which contains the active principle of this invention obtained in the example 2 of manufacture, and the example 3 of manufacture 2% of the weight, stimulative [ any ] was not accepted in a pasting part, but stimulative [ all / 30 / over the human skin ] was judged to be negative to it.

[0057] (5) The regions of back of five female guinea pigs of a with a primary-skin-irritation-test weights [ 330-400g ] Hartley system were shaved, 50% water ethanol solution which contains the active principle of this invention obtained in the example 2 of manufacture 5% of the weight was made respectively 20microl spreading, the condition of the skin of the spreading section was observed 24 hours and 48 hours after, and it evaluated about generation of erythema and an edema. Consequently, the rate of a positivity is 0% and was judged that the skin primary irritation nature of the active principle of this invention is very low.

[0058] (6) The regions of back of five female guinea pigs of a phototoxicity specimen piles [ 330-400g ] Hartley system were shaved, after making respectively 50% water ethanol solution which contains the active principle of this invention obtained in the example 2 of manufacture 10% 20microl spreading, the distance of about 10cm was separated from the exposure light source (light source: Toshiba floor line20 S-BLB, 5 LGT juxtaposition equipment activity), each was fixed, and ultraviolet A (UV-A) was irradiated for 1 hour. The condition of the skin of the spreading section was observed after [ an exposure ] 24 hours and, and 48 hours after, and it evaluated about generation of erythema and an edema. Consequently, the rate of a positivity is 0% and was judged that the phototoxicity of the active principle of this invention is very low.

[0059] The seed of the vegetation belonging to the Juglandaceae pecan group which is the active principle of this invention, or the extract of seed husks has the very high active oxygen elimination effectiveness and lipid-peroxidation depressor effect so that clearly from the result of the above trial, and the component of this extract -- a relative -- vegetation -- it is a different component from the active oxygen elimination active ingredient of the extract of the husks of the walnut belonging to a walnut group (Juglans), and safety is high.

[0060] The example about the food which blended the active oxygen elimination agent and this active principle of this invention with below, feed, and cosmetics is shown.

Example 1 After mixing with the component of the tablet following formula with the conventional method and adjusting grain size through the wire gauze of 60 meshes, one tablet was manufactured using the tableting machine.

[0061]

[A table 8]

第 8 表

成 分	重 量
製造例 2 で得た本発明の有効成分	1 0 0 m g
D-マニトール	1 5 0 m g
結晶セルロース	5 0 m g
バレイショデンプン	2 8 m g
カルボキシメチルセルロースカルシウム	1 6 m g
タルク	4 m g
ステアリン酸マグネシウム	2 m g

[0062] Example 2 The gelatine capsule was filled up and one capsule was manufactured, after mixing with the component of the capsule following formula well with the conventional method and preparing grain size through the wire gauze of 60 meshes.

[0063]

[A table 9]

第 9 表

成 分	重 量
製造例 2 で得た本発明の有効成分	1 0 0 m g
トウモロコシデンプン	1 5 0 m g
タルク	8 0 m g
ステアリン酸マグネシウム	3 0 m g

[0064] Example 3 The component of the powder following formula was mixed to homogeneity with the conventional method, and one bundle of powder was manufactured.

[0065]

[A table 10]

第 1 0 表

成 分	重 量
製造例 3 で得た本発明の有効成分	1 0 0 m g
バレイショデンプン	1 0 0 m g
乳糖	2 0 0 m g

[0066] Example 4 It mixed with the component of the injections following formula according to the conventional method, and after filtration, autoclave sterilization was performed and injections ampul was manufactured, after filling up the container and sealing.

[0067]

[A table 11]

第 1 1 表

成 分	重 量
製造例 1 で得た本発明の有効成分	1 0 0 m g
ポリオキシエチレン硬化ヒマシ油	5 0 0 m g
注射用蒸留水	9 6 0 0 m g

[0068] Example 5 The mixed dissolution of the component of the gel ointment following formula was carried out with the conventional method at homogeneity, and 10g of gel ointments was manufactured.

[0069]

[A table 12]

第 1 2 表

成 分	配合割合 (重量%)
製造例 1 で得た本発明の有効成分	0. 0 5
プロピレングリコール	1 0. 0
カルボキシビニルポリマー	1. 0
トリエタノールアミン	1. 0
香料	0. 0 5
精製水	8 7. 9

[0070] Example 6 Mayonnaise 100g was manufactured gradually [ component / b ], having continued a component of the mayonnaise following formula after churning / mixing, and fully continuing churning in a mixer.

[0071]

[A table 13]

第 1 3 表

成 分	配合割合 (重量%)
a 成分:	
製造例 3 で得た本発明の有効成分	0. 1
卵黄	1 5. 0
醸造酢	1 4. 2
調味料	0. 3
香辛料	0. 4
b 成分:	
サラダ油	7 0. 0

[0072] Example 7 The hot water extract of the husks of the pecan nuts obtained in the example 3 of manufacture in the mayonnaise of mayonnaise marketing is added, and it is O<sub>2</sub> of creation time and 48 hours after. - Elimination activity was measured. The rate of O<sub>2</sub>-elimination of the extract of each concentration is shown in the 14th table.

[0073]

[A table 14]

第 1 4 表

エキス濃度 (p p m)	O <sub>2</sub> - 消去率 (%)	
	作成時	作成 4 8 時間後
0	0	0
9 3. 8	2 3. 7	2 2. 0
1 8 7. 5	3 9. 0	3 7. 8
8 7 5	5 0. 7	5 6. 7
7 5 0	7 8. 9	8 4. 2
1 5 0 0	—*	9 2. 7

\* : スケールオーバーで測定不可

[0074] Example 8 The remaining components were added and one candy was manufactured, before solidifying having added the water of optimum dose to the cane sugar and the starch syrup of a component of the candy following formula, having heated to 150 degrees C under ordinary pressure with the conventional method, and cooling.

[0075]

[A table 15]



第15表

成 分	配合割合 (重量%)
製造例3で得た本発明の有効成分	0. 2
ショ糖	50. 0
水飴	48. 6
クエン酸	1. 0
香料	0. 2

[0076] Example 9 The component of the chewing gum following formula was scoured by the kneader with the conventional method, and one chewing gum was manufactured.

[0077]

[A table 16]

第16表

成 分	配合割合 (重量%)
製造例1で得た本発明の有効成分	0. 2
ガムベース	35. 0
粉糖	42. 0
ゲルコース	20. 0
炭酸カルシウム	2. 0
香料	0. 8

[0078] Example 10 Bottling of the filtrate which agitated the component of the drink following formula with the conventional method, and was filtered after mixing to homogeneity was carried out, it was sterilized, and one bottle of drink was manufactured.

[0079]

[A table 17]

第17表

成 分	配合割合 (重量%)
製造例1で得た本発明の有効成分	0. 1
果汁	20. 0
蜂蜜	5. 0
ショ糖	5. 0
アスコルビン酸	0. 1
香料	0. 1
ミネラルウォーター	69. 7

[0080] Example 11 The hot water extract of the husks of the pecan nuts obtained in the example 3 of manufacture to the orange juice of drink marketing is added, and it is O2 of creation time and 48 hours after. - Elimination activity was measured. O2 of the extract of each concentration - The rate of elimination is shown in the 18th table.

[0081]

[A table 18]

第18表

エキス濃度 (ppm)	O <sub>2</sub> - 消去率 (%)	
	作成時	作成48時間後
0	0	0
24	0.4	2.4
47	20.1	20.4
94	32.6	33.9
188	52.7	46.7
375	78.8	81.3
750	95.2	97.9
1500	100	100

[0082] Example 12 The hot water extract of the husks of the pecan nuts obtained in the example 3 of manufacture in the soup of soup marketing is added, and it is O<sub>2</sub> of creation time and 48 hours after. - Elimination activity was measured. O<sub>2</sub> of the extract of each concentration - The rate of elimination is shown in the 19th table.

[0083]

[A table 19]

第19表

エキス濃度 (ppm)	O <sub>2</sub> - 消去率 (%)	
	作成時	作成48時間後
0	0	0
24	14.1	7.6
47	22.6	15.9
94	37.7	26.5
188	60.5	43.4
375	82.8	79.8
750	95.1	99
1500	100	100

[0084] Example 13 The water of optimum dose was added to the component of the pet food following formula, and 1 tin of canning of pet food was manufactured with the conventional method after mixing and stone mill with the stone milling machine.

[0085]

[A table 20]

第20表

成分	配合割合 (重量%)
製造例1で得た本発明の有効成分	1.00
焙焼トウモロコシ(フレーク)	23.10
焙焼小麦(挽き割り)	23.85
骨付肉粉	17.00
魚粉	3.00
小麦胚芽粕	2.50
脱脂粉乳	2.50
乾燥ビール酵母	2.00
ラード	4.00
無機塩類混合物	1.05
ビタミン混合物	1.00

[0086] Example 14 The component of the face toilet following formula was mixed to homogeneity with the conventional method, and 100g of face toilet was manufactured.

[0087]

[A table 21]

第 2 1 表

成 分	配合割合 (重量%)
製造例 1 で得た本発明の有効成分	0. 1
エタノール	1 0. 0
1, 3-ブタンジオール	6. 0
グリセリン	5. 0
モノラウリン酸ポリオキシエチレン ソルビタン (2 0 E. O. )	1. 0
パラオキシ安息香酸メチル	0. 2
香料	0. 2
精製水	7 7. 5

[0088] Example 15 a component of the milky lotion following formula was carried out at 75 degrees C, and the heating dissolution of the b component was carried out at 73 degrees C, respectively, and in addition, it emulsified gradually, agitating b component for a component, the active principle and perfume of this invention were added, it mixed to homogeneity, and 100g of milky lotions was manufactured.

[0089]

[A table 22]

第 2 2 表

成 分	配合割合 (重量%)
製造例 1 で得た本発明の有効成分	0. 1
a成分:	
スクワラン	5. 0
ワセリン	2. 0
サラシミツロウ	0. 5
ソルビタンセスキオレイン酸エステル ポリオキシエチレンオレイルエーテル (2 0 E. O. )	0. 8
b成分:	1. 2
プロピレングリコール	5. 0
エタノール	5. 0
カルボキシビニルポリマー (1 %水溶液)	2 0. 0
水酸化カリウム	0. 1
パラオキシ安息香酸メチル	0. 3
精製水	5 9. 8
香料	0. 2

[0090] Example 16 50% water ethanol extract of the husks of the pecan nuts obtained in the example 1 of manufacture in the milky lotion (however, thing except perfume) in the milky lotion example 15 is added, and it is O2 of creation time and 48 hours after. - Elimination activity was measured. O2 of the extract of each concentration - The rate of elimination is shown in the 23rd table.

[0091]

[A table 23]

第 2 3 表 乳液の $O_2^-$  消去率 (SOD様活性)

エキシ濃度 (ppm)	$O_2^-$ 消去率 (%)	
	作成時	作成 4 8 時間後
0	0	0
9 3. 8	3 1. 9	1 6. 8
1 8 7. 5	4 6. 8	4 7. 9
3 7 5	6 1. 1	7 2. 9
7 5 0	8 3. 6	9 0. 3
1 5 0 0	9 3. 7	9 7. 5

[0092] Example 17 Heating fusion of the b component was carried out for a component of the cream following formula at 75 degrees C at 73 degrees C, respectively, and in addition, it emulsified gradually, agitating b component for a component, the active principle and perfume of this invention were added in the place cooled to 55 degrees C, it mixed to homogeneity with the homogenizer, and cream 100g was manufactured.

[0093]

[A table 24]

第 2 4 表

成 分	配合割合 (重量%)
製造例 2 で得た本発明の有効成分	0. 1
a 成分:	
ワセリン	30. 0
流動パラフィン	20. 0
パラフィン	7. 0
ラノリン	4. 0
セスキオレイン酸ソルビタン	4. 0
b 成分:	
プロピレングリコール	2. 5
硫酸マグネシウム	0. 2
パラオキシ安息香酸メチル	0. 2
精製水	31. 8
香料	0. 2

[0094] Example 18 The component of the baths following formula was mixed with the conventional method, and 100g of baths was manufactured.

[0095]

[A table 25]

第 2 5 表

成 分	配合割合 (重量%)
製造例 3 で得た本発明の有効成分	0. 5
硫酸ナトリウム	44. 0
炭酸水素ナトリウム	52. 0
カルボキシメチルセルロースナトリウム	1. 0
色素	1. 5
香料	1. 0

[0096]

[Effect of the Invention] According to this invention, it has the very high active oxygen elimination effectiveness and lipid-peroxidation depressor effect from a specific vegetable seed or specific vegetable seed husks, and an active principle with high safety is obtained easily. The constituent which contains this thing as an active principle can aim at the improvement and prevention of many symptoms acting as the various diseases caused by active oxygen and peroxy lipid or the failure on cosmetics.

[Translation done.]

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2000-72686

(P2000-72686A)

(43) 公開日 平成12年3月7日 (2000.3.7)

(51) Int.Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	ページ* (参考)
A 6 1 K 35/78	A E D	A 6 1 K 35/78	A E D C 2 B 0 0 5
A 2 3 K 1/16	3 0 4	A 2 3 K 1/16	3 0 4 C 2 B 1 5 0
		1/18	A 4 B 0 1 4
A 2 3 L 1/30		A 2 3 L 1/30	B 4 B 0 1 7
2/52		2/38	C 4 B 0 1 8
審査請求 未請求 請求項の数 3 F D (全 15 頁) 最終頁に続く			

(21) 出願番号 特願平10-261021

(22) 出願日 平成10年9月1日 (1998.9.1)

(71) 出願人 000169466

高砂香料工業株式会社

東京都大田区蒲田五丁目37番1号

(72) 発明者 川田 泉

神奈川県平塚市西八幡1丁目4番11号 高

砂香料工業株式会社総合研究所内

(74) 代理人 100074077

弁理士 久保田 藤郎 (外1名)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 活性酸素消去剤およびこれを含有する組成物

(57) 【要約】

【課題】 活性酸素消去能および抗酸化能が非常に高く、且つ人体に対する副作用が少なく、安全性の高い活性酸素消去剤を提供すること、ならびにこれを含有する組成物（食品、飼料または化粧品）を提供すること。

【解決手段】 クルミ科ペカン属に属する植物の種子または種子殻抽出物を含有する活性酸素消去剤ならびに該活性酸素消去剤を含有する食品、飼料または化粧品。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 クルミ科ペカン属に属する植物の種子または種子殻抽出物を含有する活性酸素消去剤。

【請求項2】 請求項1記載の抽出物が、水、メタノール、エタノール、n-プロパノール、iso-プロパノールおよびアセトンの中から選ばれる1種または2種以上の混合溶媒で抽出されたものである請求項1記載の活性酸素消去剤。

【請求項3】 請求項1記載の活性酸素消去剤を含有する食品、飼料または化粧品。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、活性酸素消去剤およびこれを含有する組成物に関し、詳しくはクルミ科ペカン属に属する植物の種子または種子殻の抽出物を含有する活性酸素消去剤並びにこの活性酸素消去剤を含有する組成物に関するものである。

## 【0002】

【従来の技術】酸素は生体にとって代謝によるエネルギーの産生等生命の維持には必須な物質であるが、生体内外での諸反応系、すなわち一部の免疫反応や紫外線・放射線照射等により反応性に富んだ活性酸素種（スーパーオキシドアニオン： $O_2^-$ 、過酸化水素： $H_2O_2$ 、ヒドロキシルラジカル： $OH\cdot$ 、一重項酸素： $^1O_2$ 等）を産生する。これらの活性酸素種は、例えばある免疫反応においては侵入した細菌等の異物を不活性化することには役に立つ一方で、生体成分と反応して脂質の過酸化、蛋白質や核酸の変性を引き起こし、種々の疾病や老化の促進の原因となることが知られている。特に皮膚は、身体の外層にあるために、紫外線や放射線等の外部要因により発生する活性酸素種の影響を受け易く、これらが皮膚で過剰に産生すると、ラジカル反応による過酸化脂質の生成やシミ、ソバカス等の皮膚の異常な色素の産生が増強されることが知られている。

【0003】生体内で種々の原因により生じた $O_2^-$ は、スーパーオキシドディスムターゼ（以下SODと略記する）により $H_2O_2$ に変換され、さらに $H_2O_2$ はカタラーゼやグルタチオンペルオキシダーゼの作用によって水と酸素とに分解される。これらの酵素に加えて生体内にはビタミンCやビタミンE等の食品由来の抗酸化物質が存在し、これらが生体内のラジカル反応や酸化反応を抑制するネットワークを形成して活性酸素による諸障害の防御にあたると考えられている。しかし、周囲ならびに生体内の環境の変化、例えば細菌やウイルス等による感染、食物の摂取状態や栄養状態の変化、紫外線の過剰な照射、周囲から受ける種々のストレスおよび加齢・老化等により上記のネットワークのバランスが崩れると、生体内で産生される活性酸素の代謝バランスが崩れ、結果として過酸化脂質量の増加、皮膚炎、シミ、シワ、湿疹、ソバカス等の美容上の障害となる諸症状が現れ、さらに

は関節リウマチ、動脈硬化、糖尿病、肝炎、腎炎や癌等の疾病が引き起こされることが知られている。

【0004】また、我々が摂取する食品や食品添加物についても、紫外線や放射線の作用により発生する活性酸素による酸化や通常の酸化によって、それらに含まれている脂質その他の成分の過酸化や変性が起こり、それら酸化、変性物の摂取は健康上好ましくないことは周知のことである。さらに、化粧品、皮膚外用剤に配合されることがある不飽和脂質を含む天然油脂や界面活性剤の中には、紫外線等の作用によって酸化を受け易いものがあることが知られており、結果として変色や異臭の発生等の好ましくない現象が起こることが多い。このような酸化を受け易い化粧品基剤の使用によって、前述の諸原因によって皮膚に生ずる脂質過酸化物の量が増大し、上記の美容上の障害となる諸症状が増幅されることは容易に推測されることである。

【0005】これら酸化を受け易い天然油脂としては、アーモンド油、オリーブ油、ホホバ油やスクワレン等の不飽和系の油脂、また酸化を受け易い界面活性剤としては、モノオレイン酸グリセリンやトリオレイン酸ポリオキシエチレンソルビタン等の不飽和系の界面活性剤が挙げられる。従来、化粧品、食品、食品添加物および飼料に添加されている抗酸化剤としては、ジブチルヒドロキシトルエン（BHT）、ブチルヒドロキシアニソール（BHA）、エトキシキン等の合成抗酸化剤の他、アスコルビン酸やビタミンE等の天然抗酸化剤がある。上記の合成抗酸化剤は、抗酸化効果は優れているが、発癌性等の安全性に問題があるものがあり、その使用については制限されているものもある。一方、上記の天然由来の抗酸化剤は、安全性については評価されるものの、抗酸化効果は合成抗酸化剤よりもかなり劣るという欠点がある。

【0006】近年、上記諸事象の改善・予防のために、活性酸素消去効果や抗酸化効果を有する物質もしくは組成物の化粧品科学的、食品科学的または薬学的見地からの探索が活発に行われ、その結果、かなりの数の活性酸素消去剤や抗酸化剤が知られるようになった。例えば、特公平4-34969号公報では、オウゴンに含まれるフラボノイド成分であるバイカレインを含有する活性酸素消去剤が、特開平3-227938号公報では、クローブ油またはその成分であるデハイドロジオイゲノールから成る活性酸素消去剤が、特開平5-271063号公報では、アスバラサス・リネアリス抽出物を有効成分とする活性酸素消去・除去剤が、また特開平7-69912号公報では、胡桃殻抽出物を有効成分とする活性酸素消去剤等が提案されている。

【0007】さらに、活性酸素消去効果を有する成分を配合した化粧料や食品も提案されており、特開平5-32556号公報では、活性酸素除去作用を有するイチョウ抽出物にさらにSODを添加した皮膚外用剤が、特開

10

30

40

50

平5-316963号公報では、ウラジロガシおよび／またはシラカシの抽出成分を有効成分とする化粧品および食品が、特開平6-65043号公報では、活性酸素除去作用を有するマイカイカ、モッカおよびイクリニンから選ばれる植物の抽出物の1種または2種以上ならびにSODを含有することを特徴とする皮膚外用剤が、特開平6-183987号公報では、高い活性酸素除去作用および過酸化脂質生成抑制効果を有するペラルゴニウム属植物抽出物を有効成分とする過酸化脂質生成抑制剤およびこれを有効成分とする組成物（化粧品、食品、医薬品）が、また特開平7-213251号公報では、カカオ豆から抽出した抗酸化物質を添加した健康食品等が提案されている。

#### 【0008】

【発明が解決しようとする課題】本発明の目的は、活性酸素消去能および抗酸化能が非常に高く、且つ人体に対する副作用が少なく、安全性の高い活性酸素消去剤を提供すること、ならびにこれを含有する組成物（食品、飼料または化粧品）を提供することである。本発明者らは、上記課題を解決するため鋭意研究した結果、食用として用いられているクルミ科ペカン属の植物の種子または種子殻を水、熱水、メタノール、エタノール、プロパノール、アセトン等の有機溶媒およびこれらの混合溶媒で抽出して得られる抽出物に非常に強い活性酸素消去能および抗酸化能があること、また該抽出物は安全性が高いことを見出して本発明を完成した。

#### 【0009】

【課題を解決するための手段】すなわち、請求項1記載の本発明は、クルミ科（Juglandaceae）ペカン属（Carya）に属する植物の種子または種子殻抽出物を含有する活性酸素消去剤である。請求項2記載の本発明は、請求項1記載の抽出物が、水、メタノール、エタノール、n-プロパノール、iso-プロパノールおよびアセトンの中から選ばれる1種または2種以上の混合溶媒で抽出されたものである請求項1記載の活性酸素消去剤である。請求項3記載の本発明は、請求項1記載の活性酸素消去剤を含有する食品、飼料または化粧品である。

#### 【0010】

【発明の実施の形態】以下において、本発明を詳細に説明する。本発明で使用するクルミ科ペカン属の植物は、主として北米から中米に分布しており、その種子の胚部は古来食用とされ、種子自体をペカンナッツもしくはピーカンナッツと呼称されている。本発明の活性酸素消去剤は、当該クルミ科ペカン属植物の種子もしくは種子殻を水、熱水、メタノール、エタノール、n-プロパノール、iso-プロパノール、アセトン等の有機溶媒の単独、またはこれらの水や有機溶媒の混合溶媒、混合溶媒においては好ましくは上記有機溶媒の含水物で抽出して得られる抽出物を有効成分とするものである。

【0011】抽出方法は特に限定されるものではなく、

常法に従って行えばよい。以下に、好ましい抽出方法について説明する。抽出溶媒の使用量は特に限定されるものではなく、通常は使用するペカンナッツもしくはその殻の重量の5～100倍量とすればよい。抽出温度については、水もしくは熱水を抽出溶媒とする場合には、約20℃～120℃で行えばよい。有機溶媒もしくは含水有機溶媒を抽出溶媒とする場合には、特に限定されるものではないが、好ましくは室温下、特に好ましくは20℃～30℃の温度下で抽出する。また、抽出時間については、水もしくは熱水抽出の場合は、5～60分程度でよいが、有機溶媒もしくは含水有機溶媒による抽出の場合には、24～96時間が適当である。抽出を行った後、濾紙や脱脂綿等を用いた自然濾過、減圧濾過等の手段によって各抽出溶媒可溶部を得、次いで減圧濃縮等の手段により溶媒を留去し、さらに必要に応じて凍結乾燥や噴霧乾燥を行うことにより本発明の有効成分を得る。

【0012】こうして得られる本発明の有効成分は、極めて高い活性酸素消去効果および抗酸化効果を有し、且つ安全性が高く、加熱等の加工手段を加えても、その効果は失われることなく安定であるので、本発明の有効成分を含有させることにより安定、且つ有用な活性酸素消去剤もしくは抗酸化剤を得ることができる。また、本発明の活性酸素消去剤もしくは抗酸化剤は、前記有効成分そのものを食品や化粧品等の組成物に配合するか、または予め該有効成分を製剤化したものを前記組成物に配合して、活性酸素消去効果および抗酸化効果を賦与して前記組成物の商品価値を高めることが可能である。

【0013】製剤化の例として、錠剤、カプセル剤、散剤または顆粒剤の場合は、上記有効成分を澱粉、乳糖やマニトール等の賦型剤、カルボキシメチルセルロースやヒドロキシプロピルセルロース等の結合剤、結晶セルロースやカルボキシメチルセルロースカルシウム等の崩壊剤、タルクやステアリン酸マグネシウム等の潤滑剤、その他必要に応じて湿潤剤、着色料や香料等を適宜組み合わせることで処方することにより製剤化することができる。また、液剤としては、水性もしくは油性の乳濁剤やシロップ剤にすればよく、単シロップ、ソルビトール、メチルセルロースやカルボキシメチルセルロースナトリウム等の懸濁化剤、卵黄レシチン、ソルビタンモノ脂肪酸エステル、ラウロマクロゴールやヒマシ油等の乳化剤、その他必要に応じて防腐剤、保存剤や安定化剤等を適宜配合して製剤化することができる。軟膏の場合は、ワセリン、パラフィン、シリコン、プラスチックベース、植物油やロウ類等の疎水性基剤、精製ラノリン、カルボキシビニルポリマー、プロピレングリコールや1,3-ブタンジオール等の親水性基剤、ポリエタノールアミン等の乳化剤等を適宜配合して製剤化することができる。

【0014】本発明の組成物の内、食品の形態としては種々のものを挙げることができ、例えば味噌、醤油、マヨネーズ等の調味料、サラダオイル等の食用油に添加・

混合する他、各種調理食品；デザート類、氷菓、飴、チューインガムや果汁等の菓子・飲料等を挙げることができる。これらの食品には、使用目的に応じた任意の成分を用いることができる。例えば氷菓や飲料の場合は、果汁、甘味料、酸味料、着色料や香料等を適宜配合することができる。本発明の有効成分の食品への添加量は、その形態により適宜変えればよいが、例えば、味噌、醤油、マヨネーズ等の調味料およびサラダオイル等の食用油には全体の0.03～2重量%、その他の食品の場合には0.02～2重量%とするのが好ましい。

【0015】本発明の組成物の内、飼料の形態としては種々のものを挙げることができ、例えば家畜・家禽・魚類用の粉状、練り製品状またはペレット状の配合飼料を挙げることができる。これらの飼料には、使用目的に応じた任意の成分を用いることができ、例えば練り製品状の飼料の場合は、着色料や香料等を適宜配合することができる。本発明の有効成分の飼料への添加量は、その形態により適宜変えればよいが、一般的に全体の0.02～2重量%とするのが好ましい。

【0016】本発明の組成物の内、化粧品形態としては種々のものを挙げることができ、例えばローション、乳液、クリームをはじめとして洗顔料、パック料、メーキャップ化粧料、頭髮化粧料、口唇化粧料、爪用化粧料、浴剤や制汗剤等が挙げられる。これらの化粧品には、使用目的に応じた任意の成分を用いることができ、例えばクリームの場合は、ワセリン、パラフィン、スクワラン等の疎水性基剤、ラノリン、プロピレングリコール、1,3-ブタンジオール等の親水性基剤、脂肪酸モノグリセライド類、ソルビタン脂肪酸エステル類等の乳化剤、防腐剤、顔料、香料、その他必要に応じて栄養剤、保湿剤、美白剤および紫外線吸収剤等を常法に従って適宜配合することができる。同様に、その他の製品についても、その種類に応じた必要成分を適宜配合することができる。本発明の有効成分の化粧品への添加量は、その形態により適宜変えればよいが、化粧品全体の約0.02～2重量%とするのが好ましい。

【0017】以上のように、本発明の活性酸素消去剤は、食品、飼料、化粧品等の組成物に添加して使用することが可能であり、これら組成物に活性酸素消去効果や抗酸化効果を賦与し、これら組成物の安定性を図ると共に、それら組成物の摂取者もしくは使用者に対しても、活性酸素や過酸化脂質による諸障害から保護することが可能で、極めて有用である。

【0018】

【実施例】次に、本発明を実施例などにより詳しく説明するが、本発明はこれらによって制限されるものではない。

#### 製造例1

ペカンナッツの食用部を除去して得た種子殻を粉碎し、その粉碎物100gに50%含水エタノール500ml

(ミリリットル、以下同じ)を加えて室温下で48時間静置して抽出した。得られた含水エタノール可溶部を濾紙濾過後、40℃下で減圧濃縮してエタノールおよび水を留去し、さらに凍結乾燥して目的とする有効成分(褐色の粉体7.2g、収率7.2%)を得た。

#### 【0019】製造例2

ペカンナッツをそのまま粉碎し、その粉碎物100gに50容量%含水エタノール500mlを加えて室温下で48時間静置して抽出した。得られた含水エタノール可溶部を濾紙濾過後、40℃下で減圧濃縮してエタノールおよび水を留去し、さらに凍結乾燥して目的とする有効成分(褐色の粉体7.4g、収率7.4%)を得た。

#### 【0020】製造例3

製造例1と同様にして得た種子殻粉碎物100gに蒸留水500mlを加えて110℃下で10分間加熱抽出を行った。室温まで冷却後、水可溶部を濾紙濾過後、50℃下で減圧濃縮して水を留去し、さらに凍結乾燥して目的とする有効成分(淡褐色の粉体6.5g、収率6.5%)を得た。

【0021】上記の各製造例により得られた有効成分の赤外線吸収スペクトルは以下の通りであった。なお、本スペクトル測定装置は日本分光株式会社製IR-810型、試料調製法はKBr法により行った。

製造例1により得られた有効成分の吸収ピーク

3400～3300(broad)、2925、1615、1450、1040、830cm<sup>-1</sup>

製造例2により得られた有効成分の吸収ピーク

3400～3300(broad)、1615、1550、1450、1350、1200、840cm<sup>-1</sup>

製造例3により得られた有効成分の吸収ピーク

3400～3300(broad)、1615、1450、1350、1200、1040、830cm<sup>-1</sup>

【0022】試験例1 スーパーオキシド(O<sub>2</sub><sup>-</sup>)消去試験

本発明の有効成分のO<sub>2</sub><sup>-</sup>消去効果をC.Beauchampらの方法(Analytical Biochemistry, vol.44, pp.276-287(1971))を1部改変したニトロブルーテトラゾリウム(NBT)還元法により調べた。本法はヒポキサンチン(HPX)にキサンチンオキシダーゼ(XOD)を作用させたときに生ずるO<sub>2</sub><sup>-</sup>が、NBTを還元して暗青色のホルマゼンを生成することを利用した方法である。本系にO<sub>2</sub><sup>-</sup>消去効果を有する物質(検体=本発明の有効成分)が存在すると、生成するホルマゼンの量が減少するので、有効成分無添加時のホルマゼン生成量に対する有効成分添加時のホルマゼン生成量からホルマゼン生成阻害率を求め、本発明の有効成分のO<sub>2</sub><sup>-</sup>消去率とした。また、本法において、検体がXODの酵素作用を阻害する効果を有する場合には、O<sub>2</sub><sup>-</sup>消去効果を有しない場合でも、O<sub>2</sub><sup>-</sup>消去率が見かけ上高くなってしまいうので、本発明の有効成分がXODの阻害効果ではなく、O<sub>2</sub><sup>-</sup>消去効果を有し



ていることを確認するために、本有効成分のXOD阻害率についても検討した。

【0023】<O<sub>2</sub><sup>-</sup> 消去率の測定方法>50mM(ミルモル濃度、以下同じ)炭酸ナトリウム緩衝液(pH10.2)2.4mlに、3mM HPX水溶液0.1ml、0.75mM NBT水溶液0.1ml、3mM EDTA(エチレンジアミン四酢酸)水溶液0.1mlおよび0.15%ウシ血清アルブミン水溶液0.1mlから成る溶液に検体溶液(各製造例で得た本発明の有効成分0.3重量%を含む50%含水エタノール溶液)を反応液中の有効成分の最終濃度が後記第1表に示す濃度になるように加えた混合液をキュベット(吸収波長測定セル)に取り、精製水で0.05U(酵素単位)に希釈したXOD溶液0.1mlを添加して反応を開始し、開始3分後の560nmにおける吸光度(A)を分光光度計(日本分光株式会社製、UVDEC430B)で測定し、ホルマザン生成量を求めた。対照として、検体溶液の代わりに同量の50%含水エタノールを加えた混合液を用いて同様に吸光度(B)を測定した。さらに、検体混合液のブランクとして、検体混合液に、加熱失活させたXOD溶液を添加した反応液についても同様に吸光度(C)を測定し、次式1より本発明の有効成分のO<sub>2</sub><sup>-</sup> 消去率を計算した。

【0024】

\*

第1表

検体	反応液中の有効成分の濃度 (ppm)	O <sub>2</sub> <sup>-</sup> 消去率 (%)	XOD阻害率 (%)
製造例1で 得た検体	100	99.4	4.1
	50	98.1	0.0
	25	96.9	0.0
製造例2で 得た検体	100	97.4	0.0
	50	95.1	0.0
	25	89.8	0.0
製造例3で 得た検体	100	97.2	0.0
	50	93.5	0.0
	25	86.2	0.0

【0028】第1表から判るように、本発明の有効成分は、いずれの製造法によって得た検体であっても、XODの酵素作用を殆ど阻害することなく、非常に高いO<sub>2</sub><sup>-</sup> 消去効果を示すことは明らかである。

【0029】試験例2 ヒドロキシルラジカル(OH·)消去試験

本発明の有効成分のOH·消去効果を、B.Halliwellらのデオキシリボース法(Analytical Biochemistry, vol.165, pp.215-219(1987))を1部改変した方法により調べた。本法は、フェントン試薬(過酸化水素と鉄(II)塩とを混合した酸化呈色試薬)より発生するOH·とデオキシリボースとの反応により生じるマロンジアルデヒド(MDA)を、チオバルビツール酸(TBA)と反応させることにより赤色反応物を生成させ、この生成

\*【数1】

$$O_2^- \text{ 消去率}(\%) = \frac{B - (A - C)}{B} \times 100 \quad (1)$$

【0025】<XOD阻害率の測定方法>上記O<sub>2</sub><sup>-</sup> 消去率測定方法中の0.75mM NBT水溶液の代わりに精製水0.1mlを加えた混合液を用い、上記方法と同様にXOD溶液を添加して3分後の290nmにおける吸光度(X)を測定して、HPXがXODにより酸化されて生じる尿酸の生成量を求めた。対照として、検体溶液の代わりに同量の50%含水エタノールを加えた混合液を用いて同様に290nmにおける吸光度(Y)を測定した。さらに、検体混合液のブランクとして、検体混合液に加熱失活させたXOD溶液を添加した反応液についても同様に吸光度(Z)を測定し、次式2より本発明の有効成分のXODの阻害率を計算した。以上の結果を第1表に示した。

【0026】

【数2】

$$XOD \text{ 阻害率}(\%) = \frac{Y - (X - Z)}{Y} \times 100 \quad (2)$$

【0027】

【表1】

※量を532nmにおける吸光度(TBA値)を測定することによって求めるものである。この系にOH·消去効果を有する物質(検体=本発明の有効成分)が存在すると、MDAの生成量が減少し、従ってTBA値が減少するので、本発明の有効成分無添加時のTBA値に対する本発明の有効成分添加時のTBA値から、MDA生成阻害率を求め、本発明の有効成分のOH·消去率とした。

【0030】<OH·消去率の測定方法>200mMリン酸二水素カリウム-水酸化カリウム緩衝液(pH7.4)0.2ml、28mM デオキシリボース水溶液0.2ml、1mM 塩化第二鉄水溶液0.2ml、1mM アスコルビン酸水溶液0.2ml、1.04mM EDTA水溶液0.2ml、精製水0.6ml、10mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>0.2mlおよび検体溶液

(製造例1で得た本発明の有効成分ならびに陽性対照として用いたマニトールの最終濃度が200ppmとなるように水で希釈した溶液)0.2mlからなる混合液を、37℃下1時間反応させた後、20%トリクロル酢酸水溶液2mlおよび0.67%TBA水溶液1mlを加え、沸騰水浴中で10分間加熱した。該溶液を室温まで放冷後、532nmにおける吸光度(E)を分光光度計(日本分光株式会社製、UVDEC 430B)で測定し、TBA値を求めた。検体混合液のブランクとし

\*液を用いて同様に吸光度(F)、対照として検体溶液の代わりに精製水を加えた場合の吸光度(G)、また対照のブランクとして検体溶液の代わりに精製水を加え、且つ10mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>の代わりに精製水を加えた場合の吸光度(H)を測定して、式3により本発明の有効成分ならびに陽性対照のOH・消去率を計算した。以上の結果を第2表に示した。

【0031】

【数3】

$$\text{OH} \cdot \text{消去率} (\%) = \frac{(G-H) - (E-F)}{(G-H)} \times 100 \quad (3)$$

【0032】

※ ※【表2】  
第2表

検 体	最終濃度 (ppm)	OH・消去率 (%)
製造例1で得た成分	200	60.2
マニトール	200	38.2

【0033】第2表から判るように、本発明の有効成分は、非常に高いOH・消去効果を有することが明らかである。

## 【0034】試験例3 脂質の過酸化抑制試験

本発明の有効成分の脂質の過酸化抑制効果を A. Jitoe らの方法(Journal of Agricultural and Food Chemistry, vol. 40, pp. 1337-1340(1992))に従い、脂質としてリノール酸を用いて、チオシアン酸法により調べた。本法はリノール酸の過酸化物により、第一鉄イオンが第二鉄イオンに酸化されることを利用し、生成した第二鉄イオンをチオシアン錯塩として比色する方法である。

【0035】<脂質過酸化抑制率の測定方法> 99.5%エタノール4ml、99.5%エタノールに溶解した2.53重量%リノール酸溶液4.104ml、50mM リン酸緩衝液(pH7.0)8mlおよび蒸留水3.896mlに、製造例1および2で得た検体を各々4mgを各々添加した反応混合液をスクリュウキャップ★

★付きの50ml容量のバイアル中に入れ、スクリュウキャップを施した後、暗黒下40℃にセットした恒温器中に放置した。なお、陽性対照として、本発明の有効成分の代わりにジブチルヒドロキシルエンおよびα-トコフェロールをそれぞれ4mg添加した反応混合液を用意した。実験開始8日後、各反応液0.1mlに、75%含水エタノール9.7mlおよび30%チオシアン酸アンモニウム水溶液0.1mlを加えた。これに3.5%塩酸水に溶解した0.02M 塩化第一鉄溶液0.1mlを加えて、正確に3分後の500nmにおける吸光度(I)を測定した。さらに、ブランクとして、本発明の有効成分または陽性対照を添加しない場合の吸光度(J)を測定して、次式4より各成分の脂質過酸化抑制率を計算した。以上の実験結果を第3表に示した。

【0036】

【数4】

$$\text{脂質過酸化抑制率} (\%) = \frac{J-I}{J} \times 100 \quad (4)$$

【0037】

☆ ☆【表3】  
第3表

検体	反応混合液中の添加成分 の最終濃度 (ppm)	脂質過酸化抑制 率 (%)
製造例1で得た成分	200	66.7
製造例2で得た成分	200	74.7
α-トコフェロール	200	49.3
ジブチルヒドロキシルエン	200	97.3

【0038】第3表から判るように、本発明の有効成分◆50◆は非常に強い脂質過酸化抑制作用を有することは明らか

である。

#### 【0039】比較例

本発明の有効成分は、クルミ科ペカン属に属する植物の種子もしくは種子殻の抽出物である。一方、前述の如くクルミ科のオニグルミ、マンシュウグルミ等の胡桃殻の抽出物が活性酸素消去効果を示すことが明らかとされている（特開平7-69912号公報）。そこで、クルミ（Walnut；ウォルナッツ）の抽出物と本発明のペカンナッツの殻の抽出物について、それらの収率、 $O_2^-$  消去率および成分の差異の有無について検討した。

#### 【0040】（1）抽出物の収率

ペカンナッツの食用部を除去して得た殻およびクルミの食用部を除去して得た殻を別々に粉碎し、それぞれの粉碎物を得た。ペカンナッツの殻の粉碎物を2つに分け、100gずつ1L容のエrlenmeyerフラスコに入れ、1つには50%含水エタノール、あと1つには蒸留水をそれぞれ500ml加えた。クルミの殻の粉碎物に\*

\*についても全く同様に2分して、100gずつ1L容のエrlenmeyerフラスコに入れ、1つには50%含水エタノール、あと1つには蒸留水をそれぞれ500ml加えた。50%含水エタノールを加えた各粉碎物については、室温下で48時間放置した後、濾過して残渣を除いて得られたエキスを40℃下減圧濃縮後、1晩凍結乾燥してペカンナッツの殻の50%含水エタノールエキスおよびクルミの殻の50%含水エタノールエキスを得た。蒸留水を加えた各粉碎物については、110℃下で30分間加熱抽出した後、濾過して残渣を除いて得られたエキスを40℃下減圧濃縮後、1晩凍結乾燥してペカンナッツの殻の熱水エキスおよびクルミの殻の熱水エキスを得た。各エキスの各殻粉碎物に対する収率は第4表に示す通りである。

#### 【0041】

#### 【表4】

第4表 ペカンナッツおよびクルミの殻のエキスの各溶剤による収率

抽出材料	抽出溶剤	エキスの収率 (%)
ペカンナッツの殻	50%含水エタノール	6.8
クルミの殻	50%含水エタノール	2.1
ペカンナッツの殻	熱水	8.5
クルミの殻	熱水	2.4

【0042】第4表より、両溶剤による抽出においてはペカンナッツの殻のエキスの方がクルミの殻のエキスよりも2.7～3.3倍も収率が高いことが判る。

#### （2）各エキスの $O_2^-$ 消去活性

上記（1）で得た各エキスの $O_2^-$  消去活性を前記のニトロブルーテトラゾリウム還元法により検定し、各々のエキスのED<sub>50</sub>値（検体を加えない場合の吸光度から求め※

※られる $O_2^-$  産生率を100%としたときの、 $O_2^-$  消去活性を50%とするに必要な検体の濃度）を求めて、各エキスの該活性の強さを比較した。各エキスのED<sub>50</sub>値は第5表に示す通りである。

#### 【0043】

#### 【表5】

第5表 各エキスの $O_2^-$  消去活性のED<sub>50</sub>値

抽出材料	抽出溶剤	ED <sub>50</sub> 値 (ppm)
ペカンナッツの殻	50%含水エタノール	2.5
クルミの殻	50%含水エタノール	11.0
ペカンナッツの殻	熱水	3.1
クルミの殻	熱水	10.0

【0044】第5表に示したように、検体の $O_2^-$  消去活性の強さを示すED<sub>50</sub>値から判断して、ペカンナッツの殻のエキスの方がクルミの殻のエキスよりED<sub>50</sub>値が3.2～4.4倍低く、遙に強い $O_2^-$  消去活性を有することが明らかである。

#### 【0045】（3）各エキスの成分

製造例3で得たペカンナッツの殻の熱水エキスおよび同例に準じて製造したクルミの殻の熱水エキスについて、それらの成分に違いが有るか否かを薄層クロマトグラフ法（TLC法）と活性炭吸着法により検討した。

#### ①TLC法

40★TLCの測定条件は以下に示す通りである。

薄層プレート：Silica gel 60 F254（MERCK 社製）

展開溶媒：1-ブタノール：酢酸：水=6：3：1

展開：1次

展開距離：12cm

試料濃度：300ppm

塗布量：5μl/スポット

検出：UV（254nmおよび302nm）およびヨード発色

★50 【0046】ペカンナッツ殻とクルミ殻の熱水エキスの

上記TLC法による結果は、第6表に示す通りである。 \*【表6】  
【0047】 \*

第6表

エキス	Rf値
ベカンナッツの殻の熱水エキス	0, 0.14, 0.59
クルミの殻の熱水エキス	0.21, 0.61

【0048】表に示したように、ベカンナッツ殻の熱水エキスは3つの成分に分かれ、一方クルミ殻の熱水エキスは2つの成分に分かれた。各Rf値の相違から、これらエキスの成分は互いに異なる成分であると判断される。

#### 【0049】②活性炭吸着法

ベカンナッツ殻の熱水エキスとクルミ殻の熱水エキスを同じ濃度（0.3%〔重量/容量〕）となるように水に溶解し、これらの溶液に各エキスの2倍（重量）の活性炭（活性炭素（粉末））（未処理）：ナカライテスク社※  
第7表

10※製）を加えて、室温下で4時間攪拌した。その後、各処理液を濾紙（5Cタイプ：東洋濾紙社製）を用いて濾過し、ろ液を減圧濃縮した後、凍結乾燥した。得られた各ろ液の凍結乾燥物をそれぞれ0.3%（重量/容量）となるように水に溶解し、各溶液の $O_2^-$  消去活性を測定した。なお、対照としては、前記の活性炭処理前の水溶液（0.3%〔重量/容量〕）を用いた。各溶液の $O_2^-$  消去活性の測定結果は、第7表に示す通りである。

【0050】

【表7】

検 体	反応液中の成分 の濃度 (ppm)	$O_2^-$ 消去率 (%)
ベカンナッツの殻の熱水エキス (活性炭処理後のろ液の凍結乾燥物)	100	97.4
ベカンナッツの殻の熱水エキス (対照)	100	99.3
クルミの殻の熱水エキス (活性炭処理後のろ液の凍結乾燥物)	100	1.3
クルミの殻の熱水エキス (対照)	100	93.4

【0051】表から明かなように、ベカンナッツ殻の熱水エキスの活性炭処理後のろ液の凍結乾燥物の $O_2^-$  消去率は、対照と比較して変化は殆ど見られないが、クルミ殻の熱水エキスの活性炭処理後のろ液の凍結乾燥物の $O_2^-$  消去率は、対照に比べて減少している。したがって、ベカンナッツ殻の熱水エキスの $O_2^-$  消去活性成分は、活性炭処理によって該活性を失う成分ではないのに対して、クルミ殻の熱水エキスの $O_2^-$  消去活性成分は、活性炭処理によって該活性を失うことから、これらエキスの $O_2^-$  消去活性成分は異なった成分であると判断される。

#### 【0052】試験例4

本発明の有効成分の安全性試験として、単回経口投与による急性毒性試験（ラット）、変異原性試験（ネズミチフス菌（*Salmonella typhimurium*）TA 98、TA 100、TA 1535、TA 1537 および大腸菌（*Escherichia coli*）WP 2 uvraを用いるエームス試験）、皮膚感作性試験（モルモットおよびヒトパッチテスト）、皮膚一次刺激性試験（モルモット）および光毒性試験（モルモット）を実施した。

【0053】（1）単回経口投与による急性毒性試験  
体重180gのウィスター系雄ラット5匹に、製造例2★50

30★で得た本発明の有効成分を2g/Kg（体重）となるように経口投与し、引き続き2週間通常飼育したところ、死亡率は0%であった。従って、本発明の有効成分の半数致死量（LD<sub>50</sub>）は2g/Kg以上であり、毒性は極めて低いと判定された。

#### 【0054】（2）変異原性試験

上記各菌を用いてエームス試験を行った。製造例2で得た本発明の有効成分を各シャーレに200μgから5000μgとなるように添加して試験をした結果、いずれの供試菌においても、代謝活性化系の有無にかかわらず生育したコロニー数は、陰性対照（本発明の有効成分無添加）の復帰突然変異コロニー数の2倍を越えなかったため、本発明の有効成分の変異原性は陰性であると判定された。

#### 【0055】（3）感作性試験（モルモットに対するパッチテスト）

体重330〜400gのハートレー系の雌モルモット10匹の背部を剃毛し、製造例2で得た本発明の有効成分を5重量%含むアセトン溶液20μlを塗布してアジュバントパッチテストを行ったところ、陽性率は0%であり、本発明の有効成分の感作性は極めて低いと判断され

た。

【0056】(4) 感作性試験(ヒトに対するパッチテスト)

20～55歳の健康な男女30人に、製造例2および製造例3で得た本発明の有効成分を2重量%含むラノリン溶液を用いて常法に従ってパッチテストを行ったところ、30人とも貼付部位には何らの刺激性も認められず、ヒトの皮膚に対する刺激性は陰性と判断された。

【0057】(5) 皮膚一次刺激性試験

体重330～400gのハートレー系の雌モルモット5匹の背部を剃毛し、製造例2で得た本発明の有効成分を5重量%含む50%含水エタノール溶液を各々20μl塗布し、24時間および48時間後に塗布部の皮膚の状態を観察し、紅斑および浮腫の生成について評価した。その結果、陽性率は0%であり、本発明の有効成分の皮膚1次刺激性は極めて低いと判断された。

【0058】(6) 光毒性試験

体重330～400gのハートレー系の雌モルモット5匹の背部を剃毛し、製造例2で得た本発明の有効成分を10%含む50%含水エタノール溶液を各々20μl塗布した後、各々を照射光源(光源:東芝FL20S・BLB、5灯並列装置使用)から約10cmの距離を隔て\*

第8表

成 分	重 量
製造例2で得た本発明の有効成分	100mg
D-マニトール	150mg
結晶セルロース	50mg
パレイショデンプン	28mg
カルボキシメチルセルロースカルシウム	16mg
タルク	4mg
ステアリン酸マグネシウム	2mg

【0062】実施例2 カプセル剤

下記処方成分を常法により良く混和し、60メッシュの金網を通して粒度を調整した後、ゼラチンカプセルに※

※充填してカプセル剤1個を製造した。

【0063】

【表9】

第9表

成 分	重 量
製造例2で得た本発明の有効成分	100mg
トウモロコシデンプン	150mg
タルク	80mg
ステアリン酸マグネシウム	30mg

【0064】実施例3 散剤

下記処方成分を常法により均一に混合し、散剤を1包製造した。

★【0065】

【表10】

★  
第10表

成 分	重 量
製造例3で得た本発明の有効成分	100mg
パレイショデンプン	100mg
乳糖	200mg

\*て固定し、長波長紫外線(UV-A)を1時間照射し

た。照射後24時間および48時間後に塗布部の皮膚の状態を観察し、紅斑および浮腫の生成について評価した。その結果、陽性率は0%であり、本発明の有効成分の光毒性は極めて低いと判断された。

【0059】以上の試験の結果から明らかなように、本発明の有効成分であるクルミ科ペカン属に属する植物の種子または種子殻の抽出物は、極めて高い活性酸素消去効果および脂質過酸化抑制効果を有している。しかも、このエキスの成分は、類縁植物たるクルミ属(Juglans)に属するクルミの殻のエキスの活性酸素消去活性成分と異なる成分であり、且つ安全性が高い。

【0060】以下に、本発明の活性酸素消去剤ならびに該有効成分を配合した食品、飼料および化粧品についての実施例を示す。

実施例1 錠剤

下記処方の成分を常法により混和し、60メッシュの金網を通して粒度を調整した後、打錠機を用いて錠剤1個を製造した。

【0061】

【表8】

## 【0066】実施例4 注射剤

\*ルを製造した。

下記処方成分を常法に従い混和して濾過後、容器に充

【0067】

填して密封した後、高圧蒸気滅菌を施して注射剤アンブ\*

【表11】

第11表

成 分	重 量
製造例1で得た本発明の有効成分	100mg
ポリオキシエチレン硬化ヒマシ油	500mg
注射用蒸留水	9600mg

## 【0068】実施例5 ゲル軟膏剤

10※【0069】

下記処方成分を常法により均一に混合溶解して、ゲル

【表12】

軟膏剤10gを製造した。

※

第12表

成 分	配合割合(重量%)
製造例1で得た本発明の有効成分	0.05
プロピレングリコール	10.0
カルボキシビニルポリマー	1.0
トリエタノールアミン	1.0
香料	0.05
精製水	87.9

## 【0070】実施例6 マヨネーズ

★0gを製造した。

下記処方成分a成分をミキサー中で十分に攪拌・混合後、

【0071】

攪拌を続けつつb成分を徐々に加えて、マヨネーズ10★

【表13】

第13表

成 分	配合割合(重量%)
a成分:	
製造例3で得た本発明の有効成分	0.1
卵黄	15.0
醸造酢	14.2
調味料	0.3
香辛料	0.4
b成分:	
サラダ油	70.0

## 【0072】実施例7 マヨネーズ

☆第14表に示す。

市販のマヨネーズに製造例3で得たペカンナッツの殻の

【0073】

熱水エキスを添加し、作成時および48時間後の $O_2^-$ 消

【表14】

去活性の測定を行った。各濃度のエキスの $O_2^-$ 消去率を ☆

第14表

エキス濃度 (ppm)	$O_2^-$ 消去率(%)	
	作成時	作成48時間後
0	0	0
93.8	23.7	22.0
187.5	39.0	37.8
375	50.7	56.7
750	78.9	84.2
1500	—*	92.7

\*:スケールオーバーで測定不可

## 【0074】実施例8 飴

◆つ固化する前に残りの成分を加えて飴1個を製造した。

下記処方成分のショ糖および水飴に適量の水を加え

【0075】

て、常法により常圧下で150℃まで加熱し、冷却しつ◆50

【表15】

第15表

成 分	配合割合 (重量%)
製造例3で得た本発明の有効成分	0.2
ショ糖	50.0
水飴	48.6
クエン酸	1.0
香料	0.2

【0076】実施例9 チューインガム

\*【0077】

下記処方成分を常法によりニーダーで練り、チューイン

【表16】

ガム1枚を製造した。

\*10

第16表

成 分	配合割合 (重量%)
製造例1で得た本発明の有効成分	0.2
ガムベース	35.0
粉糖	42.0
グルコース	20.0
炭酸カルシウム	2.0
香料	0.8

【0078】実施例10 飲料

※【0079】

下記処方成分を常法により攪拌し均一に混合後、濾過

【表17】

した濾液を瓶詰めし、殺菌して飲料1瓶を製造した。 ※

第17表

成 分	配合割合 (重量%)
製造例1で得た本発明の有効成分	0.1
果汁	20.0
蜂蜜	5.0
ショ糖	5.0
アスコルビン酸	0.1
香料	0.1
ミネラルウォーター	69.7

【0080】実施例11 飲料

★去率を第18表に示す。

市販のオレンジジュースに製造例3で得たペカンナッツ

【0081】

の殻の熱水エキスを添加し、作成時および48時間後の

【表18】

O<sub>2</sub><sup>-</sup> 消去活性の測定を行った。各濃度のエキスのO<sub>2</sub><sup>-</sup> 消★

第18表

エキス濃度 (ppm)	O <sub>2</sub> <sup>-</sup> 消去率 (%)	
	作成時	作成48時間後
0	0	0
24	0.4	2.4
47	20.1	20.4
94	32.6	33.9
188	52.7	48.7
375	78.8	81.3
750	95.2	97.9
1500	100	100

【0082】実施例12 スープ

☆9表に示す。

市販のスープに製造例3で得たペカンナッツの殻の熱水

【0083】

エキスを添加し、作成時および48時間後のO<sub>2</sub><sup>-</sup> 消去活

【表19】

性の測定を行った。各濃度のエキスのO<sub>2</sub><sup>-</sup> 消去率を第1☆

第19表

エキス濃度 (ppm)	0 <sub>2</sub> - 消去率(%)	
	作成時	作成48時間後
0	0	0
24	14.1	7.6
47	22.6	15.9
94	37.7	26.5
188	60.5	43.4
375	82.8	79.8
750	95.1	99
1500	100	100

【0084】実施例13 ペットフード

\*造した。

下記処方の成分に適量の水を加え、らいかい機にて混合

【0085】

・らいかい後、常法によりペットフードの缶詰1缶を製\*

【表20】

第20表

成 分	配合割合(重量%)
製造例1で得た本発明の有効成分	1.00
焙焼トウモロコシ(フレーク)	23.10
焙焼小麦(挽き割り)	23.85
骨付肉粉	17.00
魚粉	3.00
小麦胚芽粕	2.50
脱脂粉乳	2.50
乾燥ビール酵母	2.00
ラード	4.00
無機塩類混合物	1.05
ビタミン混合物	1.00

【0086】実施例14 化粧水

※【0087】

下記処方の成分を常法により均一に混合して、化粧水1

【表21】

00gを製造した。

※

第21表

成 分	配合割合(重量%)
製造例1で得た本発明の有効成分	0.1
エタノール	10.0
1,3-ブタンジオール	6.0
グリセリン	5.0
モノラウリン酸ポリオキシエチレン	
ソルビタン(20E.O.)	1.0
パラオキシ安息香酸メチル	0.2
香料	0.2
精製水	77.5

【0088】実施例15 乳液

★に混合して乳液100gを製造した。

下記処方のa成分を75℃に、b成分を73℃にそれぞれ

【0089】

加熱溶解し、b成分をa成分に攪拌しつつ徐々に加え 40

【表22】

て乳化し、本発明の有効成分および香料を添加して均一★



第22表

成 分	配合割合 (重量%)
製造例1で得た本発明の有効成分	0.1
a成分:	
スクワラン	5.0
ワセリン	2.0
サラシミツロウ	0.5
ソルビタンセスキオレイン酸エステル	0.8
ポリオキシエチレンオレイルエーテル (20 E. O.)	1.2
b成分:	
プロピレングリコール	5.0
エタノール	5.0
カルボキシビニルポリマー (1%水溶液)	20.0
水酸化カリウム	0.1
パラオキシ安息香酸メチル	0.3
精製水	59.8
香料	0.2

## 【0090】実施例16 乳液

\* 活性の測定を行った。各濃度のエキスの $O_2^-$  消去率を第

実施例15における乳液 (但し、香料を除いたもの) に

23表に示す。

製造例1で得たペカンナッツの殻の50%含水エタノールエキスを添加し、作成時および48時間後の $O_2^-$  消去\*

【0091】

【表23】

第23表 乳液の $O_2^-$  消去率 (SOD様活性)

エキス濃度 (ppm)	$O_2^-$ 消去率 (%)	
	作成時	作成48時間後
0	0	0
93.8	31.9	16.8
187.5	46.8	47.9
375	61.1	72.9
750	83.6	90.3
1500	93.7	97.5

## 【0092】実施例17 クリーム

※効成分および香料を添加し、ホモジナイザーで均一に混

下記処方 of a成分を73℃に、b成分を75℃にてそれ 30 合してクリーム100gを製造した。

ぞれ加熱融解し、b成分をa成分に攪拌しながら徐々に

【0093】

加えて乳化し、55℃まで冷却したところで本発明の有※

【表24】

第24表

成 分	配合割合 (重量%)
製造例2で得た本発明の有効成分	0.1
a成分:	
ワセリン	30.0
流動パラフィン	20.0
パラフィン	7.0
ラノリン	4.0
セスキオレイン酸ソルビタン	4.0
b成分:	
プロピレングリコール	2.5
硫酸マグネシウム	0.2
パラオキシ安息香酸メチル	0.2
精製水	31.8
香料	0.2

## 【0094】実施例18 浴用剤

★【0095】

下記処方の成分を常法により混合し、浴用剤100gを

【表25】

製造した。

★

第25表

成 分	配合割合 (重量%)
製造例3で得た本発明の有効成分	0.5
硫酸ナトリウム	44.0
炭酸水素ナトリウム	52.0
カルボキシメチルセルロースナトリウム	1.0
色素	1.5
香料	1.0

【0096】

【発明の効果】本発明によれば、特定の植物の種子または種子殻から極めて高い活性酸素消去効果および脂質過酸化抑制効果を有し、且つ安全性の高い有効成分が容易\*

\*に得られる。このものを有効成分として含有する組成物は、活性酸素や過酸化脂質によって引き起こされる種々の疾病や美容上の障害となる諸症状の改善および予防を図ることが可能である。

フロントページの続き

(51)Int. Cl. <sup>7</sup> )	識別記号	F I	ターミナル (参考)
A 2 3 L 2/38		A 6 1 K 7/00	K 4 B 0 4 7
A 6 1 K 7/00			W 4 C 0 7 6
		7/48	4 C 0 8 3
		7/50	4 C 0 8 8
		9/06	G
		9/08	F
		9/20	D
		9/48	C
		A 2 3 G 3/00	1 0 1
// A 2 3 G 3/00	1 0 1	3/30	
		A 2 3 L 1/24	A
A 2 3 L 1/24		2/00	F

F ターム(参考) 2B005 AA05  
2B150 AA01 AA05 AA06 AA08 AB20  
DD31 DD42 DD57  
4B014 GB06 GB07 GB13 GG18 GK12  
GP01 GP27  
4B017 LC03 LG05 LP01 LP03  
4B018 LB01 LB08 LB09 LE03 MD57  
ME06 MF01 MF02 MF06  
4B047 LB09 LE03 LG40 LP01 LP02  
LP07  
4C076 AA07 AA12 AA13 AA30 AA37  
AA56 BB01 BB31 CC21 DD28C  
DD38A DD41C DD50F DD67A  
EE08A EE31A EE32A EE32B  
EE38A EE42H EE53E EE53F  
EE58A FF01 FF11 FF23  
GG41  
4C083 AA111 AA112 AB432 AC122  
AC132 AC242 AC432 AC542  
AD092 AD212 AD242 AD262  
AD272 BB51 CC03 DD14  
DD15 DD17 DD22 DD23 DD27  
DD41 EE11 EE13  
4C088 AB12 AC04 AC14 BA08 BA09  
BA10 MA17 MA52 MA63 NA14  
ZA89 ZC21 ZC61